HAL
open science

Production de styrène par Penicillium camemberti Thom

J. Adda, J. Dekimpe, L. Vassal, H.E. Spinnler

To cite this version:

J. Adda, J. Dekimpe, L. Vassal, H.E. Spinnler. Production de styrène par Penicillium camemberti Thom. Le Lait, 1989, 69 (2), pp.115-120. hal-00929155

HAL Id: hal-00929155

https://hal.science/hal-00929155

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Lait (1989), 69 (2) 115-120
© Elsevier/INRA

Article de recherche

Production de styrène par *Penicillium camemberti* Thom

J. Adda [1], J. Dekimpe [1], L. Vassal [2] et H.E. Spinnler [1]

[1] *INRA, Laboratoire de recherches sur les arômes, 17, rue Sully, 21034 Dijon;*
[2] *INRA, Station de recherches laitières, 78350 Jouy-en-Josas, France*

(reçu le 9-5-1988, accepté le 19-10-1988)

Résumé — L'apparition du goût de Celluloïd dans les fromages à pâte molle à croûte fleurie est liée à la présence de styrène dans ces fromages. L'accumulation de cette molécule n'est observée que sur des cultures de souches particulières de *Penicillium camemberti*. Elle semble liée à un dérèglement du métabolisme oxydatif de ces souches.

***Penicillium camemberti* – styrène – goût de Celluloïd – fromage à croûte fleurie**

Summary — Styrene production by *Penicillium camemberti* Thom. *The Celluloïd taste observed in some mould-ripened cheeses is bound to the presence of styrene in these cheeses. The accumulation of this molecule was only detected on cultures of some strains of* Penicillium camemberti. *It seems to be bound to a deregulation of oxidative metabolism of these strains.*

Penicillium camemberti – *styrene – Celluloïd taste – mould-ripened cheese*

Introduction

Les professionnels fromagers ont parfois à faire face à des problèmes d'apparition de défauts de goût ou d'arôme qui surviennent de façon inopinée et dont l'origine reste, malheureusement, le plus souvent inexpliquée. Parmi ces défauts, il en est un que les producteurs de pâte molle à croûte fleurie constatent de temps à autre, et qui peut être décrit en utilisant l'expression «goût de Celluloïd». Ce mauvais goût est, la plupart du temps, à peine perceptible, mais il peut arriver qu'il atteigne une intensité suffisante pour provoquer des réclamations de la part des consommateurs. Il devient alors beaucoup plus facile d'identifier les molécules responsables du défaut d'arôme, première étape vers l'explication de son origine. C'est ainsi qu'il a été possible de constater, en deux occasions distinctes, que ce goût de Celluloïd provenait de la présence dans le fromage de quantités anormalement élevées de styrène. On a pu ensuite démontrer que la présence de styrène résultait de l'activité d'une souche de *Penicillium camemberti* Thom utilisée comme levain fongique.

Matériel et Méthodes

Mise en évidence de styrène dans les fromages

Echantillons

Le premier échantillon (A) étudié était une pâte molle stabilisée produite dans l'Yonne, le second (B) une pâte molle traditionnelle produite dans l'Est. Le défaut était apparu, dans les 2 cas, vers la fin de la période d'affinage.

Analyses

Dans les 2 cas, les échantillons ont été râpés à l'état congelé, puis soumis à une extraction sous vide poussé (Dumont et Adda, 1972). Les produits volatils récupérés dans une série de pièges refroidis à l'azote liquide ont été extraits par le dichlorométhane après ajustement de la solution aqueuse à pH 9 par de la soude N/10.

La solution organique séchée sur sulfate de sodium était ensuite concentrée sous colonne de Dufton jusqu'à un volume résiduel de 50 µl environ. Un µl de cette solution a été injecté sur une colonne capillaire en silice fondue (DB5 J & W) de 30 m de long et de 0,32 mm de diamètre intérieur (épaisseur de phase 1 µm). Le gaz vecteur (H_2) circulait à la vitesse de 0,42 $msec^{-1}$. Les températures utilisées sont les suivantes: injecteur: 230 °C, détecteur: 230 °C, celle du four est programmée de 40 à 220 °C à 3° C/min.

Une dérivation en sortie de colonne permettait une appréciation olfactive des composés au fur et à mesure de leur détection par ionisation de flamme, comme il a été décrit par Georgilopoulos et Gallois (1987).

Les composés ont été identifiés par coplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que précédemment. Le spectromètre de masse utilisé est un quadripôle. Le fractionnement des molécules est effectué par bombardement électronique (énergie 70 eV).

Reproduction du défaut sur caillé modèle

Les souches de *P. candidum*, obtenues de différents fournisseurs sous forme soit lyophilisée, soit liquide, ont été cultivées sur un milieu choisi pour sa similitude de composition et de propriétés physico-chimiques avec celle d'un fromage tout en permettant une manipulation reproductible et relativement aisée. Ce milieu, dont la composition apparaît sur le Tableau I, était réparti en fioles de Roux à raison de 100 ml par fiole, puis autoclavé à 118 °C pendant 15 min, avant d'être ensemencé par une suspension de spores. Les fioles étaient alors incubées à 12 °C à l'obscurité pendant 3 semaines environ.

Résultats et discussion

Mise en évidence du styrène dans les fromages

L'extraction des 2 échantillons étudiés a permis d'obtenir une solution organique dont l'odeur rappelait, en plus concentrée,

Tableau I. Composition d'un milieu de culture de composition équivalente à celle d'un fromage.

Constituants	%
Crème à 50% M.G.	36
Protéines laitières Prosobel* L85	20,5
NaCl	2
Acide lactique à 10% (p/v)	21
Eau distillée	20,5
pH 4,7	

* Bel Industries (protéines 80,4%; lactose 4,4%; cendres 6,8% et calcium 2%).

celle des fromages dont elle provenait. La séparation chromatographique permettait, dans les 2 cas, de mettre en évidence un composé majeur, dont l'odeur, perçue en sortie de colonne, rappelait celle des échantillons. Ce composé avait un temps de rétention identique à celui du styrène et son spectre de masse permettait d'affirmer, sans ambiguïté, qu'il s'agissait bien de ce composé.

L'injection de quantités connues de styrène a conduit à estimer la quantité présente dans l'échantillon B à environ 5 $mg \cdot kg^{-1}$ de fromage, soit une quantité 1 000 fois supérieure au seuil de perception mesuré, il est vrai, dans de la crème acide (Miltz *et al.*, 1980).

Il convient de souligner que la mise en évidence de cet hydrocarbure dans un fromage n'est pas une nouveauté en soi, puisque le styrène a déjà été signalé dans un certain nombre d'échantillons de fromages de divers types comme le langres (Dumont *et al.*, 1974a), le vacherin (Dumont *et al.*, 1974b), le camembert (Dumont *et al.*, 1977), le comté (Dumont *et al.*, 1981) mais toujours à l'état de traces et sans qu'il soit possible de lui imputer un rôle organoleptique particulier.

La présence de styrène résulte de l'activité du Penicillium

Huit souches de *P. camemberti*, provenant de 2 fournisseurs différents, parmi lesquelles la souche X utilisée pour la fabrication de l'échantillon A, ont été mises en culture sur un milieu modèle solide stérile. Les fioles ont fait l'objet d'un examen olfactif à intervalle régulier. L'odeur caractéristique associée à la présence de styrène apparaissait uniquement sur les fioles ensemencées avec la souche X, au bout d'une période de 3 semaines environ et la présence de styrène était confirmée, dans ce cas, par l'analyse. Aucune odeur anormale n'était observée avec les autres souches cultivées dans les mêmes conditions. Il apparaissait donc que la présence de styrène était associée à l'utilisation d'une souche donnée, ce qui recoupait les observations faites sur les lieux de production du fromage A. Il est toutefois à signaler qu'il n'a pas été possible de reproduire le défaut, lorsque la souche X était utilisée dans une fabrication expérimentale de fromage de type Camembert, ce qui tendrait à prouver que la production de styrène par une souche donnée n'est pas constante et qu'elle dépend de facteurs externes.

Il se pourrait aussi que le styrène soit formé par l'ensemble des souches, mais qu'il ne soit qu'un composé intermédiaire transformé au fur et à mesure en ß-phényléthanol selon un mécanisme d'hydroxylation identique à celui qui a été démontré sur une souche de *Pseudomonas* (Shirai et Hisatsuka, 1979a et b). L'accumulation de styrène ne se produirait dans le fromage que lorsque la souche deviendrait incapable de réaliser la réaction d'hydroxylation conduisant au ß-phényléthanol.

Origine du styrène

S'il apparaît comme certain que la présence de styrène soit liée à l'activité du *Penicillium*, il reste à comprendre par quelle voie cet hydrocarbure peut être formé. Oliviero (1906), puis Jaminet (1950) ont constaté qu'*Aspergillus niger* et *Penicillium glaucum* pouvaient produire du styrène par décarboxylation de l'acide cinnamique tandis que Chen et Peppler (1956) montraient que *Saccharomyces cerevisiae* pouvait réaliser cette même conversion. On pourrait donc penser, par analogie, que *P. camemberti* puisse être capable de décarboxyler l'acide cinna-

mique ou un composé de structure voisine présent dans les fromages.

L'acide cinnamique lui-même n'a jamais été mis en évidence dans aucun fromage; le cinnamate d'éthyle a, en revanche, été identifié dans le camembert (Moinas *et al.*, 1975). Il faut toutefois remarquer que cet ester n'a jamais été mis en évidence dans aucune autre étude portant sur le camembert ou tout autre type de fromage et l'analyse des échantillons étudiés ici n'a pas permis de déceler la moindre trace d'un tel précurseur. Il apparaît donc difficile de retenir l'hypothèse d'une production de styrène par décarboxylation d'une structure cinnamique par *P. camemberti.*

Nous sommes donc conduits à rechercher d'autres hypothèses sur l'origine du styrène en nous fondant sur d'autres anomalies du profil aromatique relevé sur l'échantillon B.

Etude du profil aromatique de l'échantillon B

L'étude de ce profil a permis de mettre en évidence un certain nombre d'anomalies par comparaison avec les données déjà publiées sur l'arôme de camembert (Moinas *et al.*, 1973; Groux et Moinas, 1974; Adda et Dumont, 1974; Dumont *et al.*, 1974a et c; Moinas *et al.*, 1975; Karahadian *et al.*, 1985a).

Notons en premier lieu, sans pour autant y apporter une explication, la quasi-absence de l'heptanone–2 et de son composé de réduction, l'heptanol–2 qui sont, en règle générale, présents en quantités équivalentes à celles de l'octen-1 ol–3 (pic 18, Fig. 1) dans les fromages de ce type. Ce dernier est ici accompagné de quantités relativement importantes d'octadien–1,5 ol–3 (pic 17, Fig. 1). Ce

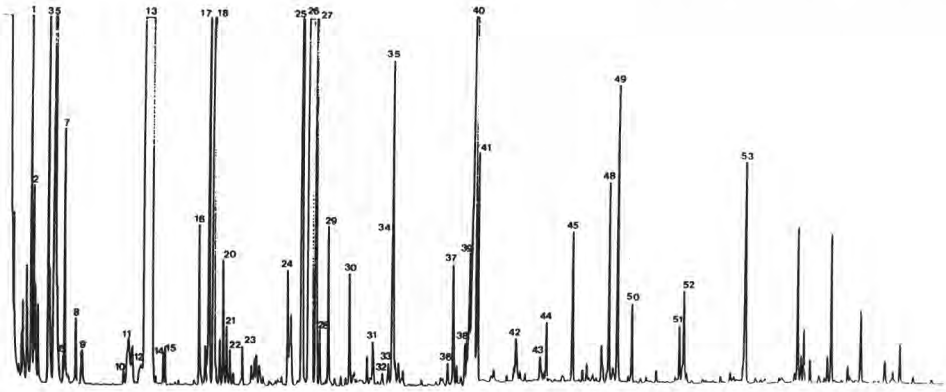

Fig. 1. Profil chromatographique des produits volatils neutres de l'échantillon B. * La présence de ces composés pourrait être liée à l'emballage du fromage. 1. pentanone-2; 2. pentanol-2; 3. méthyl-3 butanol-1; 4. méthyl-2 butanal 1; 5. disulfure de diméthyle; 6. pentanol; 7. toluène; 8. hexanone-2; 9. butyrate d'éthyle; 10. xylène; 11. hexanol; 12. heptanone-2; 13. styrène; 14. diméthyl sulfone; 15. méthoxybenzène; 16. benzaldéhyde; 17. octadien-1,5 ol-3; 18. octen-1 ol-3; 19. octanone-3; 20. octanone-2; 21. octanol-3; 22. éthylméthylbenzène; 23. dichlorobenzène; 24. octanol-1; 25. nonen-8 one-3; 26. nonanone-2; 27. nonanol-2; 28. nonanal; 29. phényl-2 éthanol; 30. cyanure de benzyle; 31. diméthoxy-1,3 benzène; 32. décanone-2; 33. octanoate d'éthyle; 34. naphtalène; 35. α-terpinéol; 36. decen-3 ol-1; 37. décanol-1; 38. acétate d'octen-3 yle; 39. undécénone-2; 40. undécanone-2 + undécanol-2; 41. indole; 42. nicotine; 43. décanoate d'éthyle; 44. méthyl indole; 45. ß-caryophyllène; 46. S thiobenzoate d'éthyle; 47. dodécanol; 48. tridécénone; 49. tridécanone-2; 50. BHT*; 51. laura-

composé est un métabolite de *P. camemberti*, comme l'ont démontré Karahadian *et al.* (1985b). Il semble formé par oxydation de l'acide linolénique selon un mécanisme enzymatique semblable à celui qui conduit à l'octen–1 ol–3 à partir de l'acide linoléique.

La présence d'octadien–1,5 ol–3 n'a jamais, à ce jour, été signalée dans le camembert lui-même, ce qui tendrait à montrer qu'il y est habituellement, soit totalement absent, soit présent à l'état de traces difficiles à mettre en évidence. Son abondance ici serait le signe d'une activité oxydative intense du *Penicillium*, hypothèse corroborée par l'importance du benzaldéhyde (pic 16, Fig. 1), normalement présent en très faible quantité seulement, dans le camembert, et par la présence d'autres composés insaturés tels le decen–3 ol–1 (pic 36, Fig. 1) et l'acétate d'octen–3 yle (pic 38, Fig. 1) dont la présence n'a jamais été reconnue jusqu'alors dans les fromages. On peut ajouter à ces indices d'exaltation des mécanismes oxydatifs, la présence de toluène et de naphtalène en quantités notablement supérieures à celles habituellement trouvées dans les fromages.

Conclusion

L'origine de ces hydrocarbures mis en évidence de façon constante dans tous les fromages, quel qu'en soit le type, reste encore obscure. On peut être tenté de reprendre l'hypothèse formulée par Johnson *et al.* (1969) selon laquelle leur existence dans de nombreux aliments d'origine végétale pourrait résulter de l'oxydation de carotène. On expliquerait ainsi la présence constatée ici de naphtalène et de toluène en quantités relativement abondantes par une dégradation poussée des carotènes normalement présents dans les lipides du lait. Cette hypothèse aurait le mérite d'aller dans le sens des observations faites sur l'échantillon B et qui conduisent toutes à souligner l'importance des phénomènes oxydatifs.

Il reste à confirmer le rôle du carotène comme précurseur du styrène en utilisant du carotène marqué, puis à comprendre comment, sous l'influence de conditions de milieu particulières, il y aurait une activation du métabolisme oxydatif du *Penicillium* de façon comparable à ce qui a pu être démontré sur la levure, pour laquelle l'activité du peroxyzome semble liée aux conditions externes (Szabo et Avers, 1969).

Références

Adda J. & Dumont J.P. (1974) Les substances responsables de l'arôme des fromages à pâte molle. *Lait* 54, 1-22

Chen S.L. & Peppler H.J. (1956) *J. Biol. Chem.* 221, 101, cité par Kieslich K. (1976) *In : Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds.* Thieme, Stuttgart

Dumont J.P. & Adda J. (1972) Isolement des constituants de l'arôme des fromages : comparaison de méthodes. *Lait* 52, 311-323

Dumont J.P., Roger S. & Adda J. (1974a) Etude des composés volatils neutres présents dans les fromages à pâte molle et à croûte lavée. *Lait* 54, 31-43

Dumont J.P., Roger S., Cerf P. & Adda J. (1974b) Etude des composés volatils neutres présents dans le vacherin. *Lait* 54, 243-251

Dumont J.P., Roger S., Cerf P. & Adda J. (1974c) Etude des composés neutres volatils présents dans le camembert. *Lait* 54, 501-516

Dumont J.P., Delespaul G., Mignot B. & Adda J. (1977) Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle. *Lait* 57, 619-630

Dumont J.P., Adda J. & Rousseaux P. (1981) Exemple de variation de l'arôme à l'intérieur d'un même type de fromage : le comté. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 14, 198-202

Georgilopoulos D.M. & Gallois A. (1987) Aroma compounds of fresh blackberries. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184, 374-380

Groux M. & Moinas M. (1974) Etude comparative de la fraction volatile neutre de divers fromages. *Lait* 54, 44-52

Jaminet F. (1950) Au sujet d'un processus de fermentation hydrocarbonique observé dans une potion au sirop de tolu. *J. Pharm. Belg.* 5, 191-201

Johnson A.E., Nursten H.E. & Self R. (1969) Aromatic hydrocarbons in foodstuffs and related materials. *Chem. Ind.* 4 janv., 11-12

Karahadian C., Josephson D.B. & Lindsay R.C. (1985a) Contribution of *Penicillium* sp. to the favors of brie and camembert cheese. *J. Dairy Sci.* 68, 1865-1877

Karahadian C., Josephson D.B. & Lindsay R.C. (1985b) Volatile compounds from *Penicillium* sp. Contributing Musty-Earthy Notes to brie and camembert cheese flavors. *J. Agric. Food Chem.* 33, 339-343

Miltz J., Elisha C. & Mannheim C.H. (1980) Sensory threshold of styrene and the monomer migration from polystyrene food packages. *J. Food Process. Preserv.* 4, 281-289

Moinas M., Groux M. & Horman I. (1973) La flaveur des fromages. I. Une méthodologie nouvelle d'isolement de constituants volatils : application au roquefort et au camembert. *Lait* 54, 601-609

Moinas M., Groux M. & Horman I. (1975) La flaveur des fromages. III. Mise en évidence de quelques constituants mineurs de l'arôme de camembert. *Lait* 55, 414-417

Oliviero G. (1906) Réduction de l'acide cinnamique en cinnamène par les mucédinées. *J. Pharm. Chim.* 24, 62-64

Shirai K. & Hisatsuka K. (1979a) Production of ß-phenethyl alcohol from styrene by *Pseudomonas* 305-ST R-I-L. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1399-1406

Shirai K. & Hisatsuka K. (1979b) Isolation and identification of styrene assimilating bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1595-1596

Szabo A.S. & Avers C.J. (1969) Some aspects of regulation of peroxisomes and mitochondria in yeast. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 168, 302-312